

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 78 02927

(54) **Lyophilisats de liposomes.**

(51) Classification internationale (Int. Cl.²). **A 61 K 7/00, 47/00; F 26 B 5/06/C 07 C 43/11.**

(22) Date de dépôt **2 février 1978, à 15 h 34 mn.**

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande **B.O.P.I. — «Listes» n. 35 du 31-8-1979.**

(71) Déposant : **Société dite : L'OREAL, résidant en France.**

(72) Invention de : **Guy Vanlerberghe et Rose-Marie Handjani.**

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : **Jacques Peuscet, Conseil en Brevets, 3, square de Maubeuge, 75009 Paris.**

On sait que certains lipides possèdent la propriété de former, en présence d'une phase aqueuse, des phases mésomorphes dont l'état d'organisation est intermédiaire entre l'état cristallin et l'état liquide. Parmi ces lipides, il est connu que certains
5 peuvent gonfler en solution aqueuse pour former des sphérules dispersées dans le milieu aqueux, ces sphérules étant constituées par des couches bimoléculaires ou multimoléculaires constituant des feuillets sensiblement concentriques. Les sphérules de ce type, dénommées de façon générale liposomes, peuvent être utilisées pour
10 enfermer des solutés aqueux comportant des substances actives, lesdites substances se trouvant dans les compartiments aqueux compris entre les doubles couches lipidiques et étant ainsi protégées contre les conditions extérieures.

On a déjà proposé d'obtenir des liposomes à partir de
15 composés lipidiques ioniques, ces liposomes répondant à la formule générale



dans laquelle X est un groupe hydrophile polaire et Y est un groupe hydrophobe non polaire : par exemple, dans le brevet français
20 2 221 122, on a déjà décrit des liposomes de ce type ayant des diamètres inférieurs à 1 000 Å, et dans le brevet français 75-20456, on a déjà décrit des liposomes de ce type ayant des diamètres compris entre 1 000 et 50 000 Å. De plus, on a également décrit dans le brevet français 75-20456 des liposomes ayant un diamètre compris
25 entre 100 et 50 000 Å et obtenus à partir d'un composé lipidique dispersible dans l'eau, ayant pour formule générale



formule dans laquelle X représente un groupe hydrophile non-ionique et Y représente un groupe lipophile. On connaît donc, à ce jour,
30 des dispersions de liposomes ioniques ou non-ioniques de différentes tailles, et l'on a également décrit dans la demande de certificat d'addition français 77-34 249 des dispersions contenant plusieurs types de liposomes, chaque type renfermant des substances actives différentes.

35 L'intérêt des compositions renfermant des liposomes ioniques ou non-ioniques est en pratique limité par deux caractéristiques essentielles de ces liposomes, à savoir leur stabilité et leur imperméabilité. Il convient d'assurer pour les liposomes en cause une stabilité suffisamment grande pour que ces liposomes subsistent à
40 l'état de sphérules pendant un temps suffisamment long pour que les

compositions puissent être utilisées avant que les sphérules aient disparu par coalescence. Il faut en effet noter que l'état d'organisation thermodynamiquement stable des lipides hydratés est celui de la phase lamellaire à structure feuilletée ; il y a donc tendance à la coalescence des sphérules et cette tendance est plus ou moins prononcée selon la taille des liposomes et selon la nature des composés lipidiques qui les constituent. Par ailleurs, il convient de pouvoir disposer de liposomes qui maintiennent encapsulées les substances actives enfermées entre les doubles couches lipidiques, et à cet égard, on a d'ailleurs constaté que les liposomes ayant des tailles relativement grandes, par exemple comprises entre 1 000 et 50 000 Å, étaient plus intéressants que les liposomes ayant des tailles relativement petites, par exemple comprises entre 100 et 1 000 Å, en raison du fait que la perméabilité de ces liposomes décroît quand le diamètre moyen des liposomes augmente. Il s'avère donc d'une grande importance sur le plan pratique de trouver un moyen permettant d'éviter l'instabilité et la perméabilité des liposomes pour permettre leur utilisation satisfaisante longtemps après leur fabrication.

La présente invention a pour but de proposer un moyen tel que ci-dessus indiqué, et ledit moyen consiste à lyophiliser les dispersions de liposomes après leur préparation. On a en effet constaté, selon l'invention, que de façon tout-à-fait inattendue, les compositions contenant des liposomes, lorsqu'elles étaient lyophilisées pouvaient être réhydratées sans que la lyophilisation modifie----- la structure et la dimension des sphérules. Cette constatation est particulièrement surprenante quand on se rappelle que les liposomes ont une structure entièrement lipidique organisée autour de l'eau et que donc, contrairement aux cellules de type classique dont la lyophilisation est connue, les liposomes ne bénéficient pas de facteurs de stabilisation dus à la présence de polymères tels que les protéines. De plus, la formation des liposomes dépend de l'état d'ordre des chaînes lipidiques, c'est-à-dire est en relation directe avec la température, les lipides à chaînes longues saturées ne pouvant donner des liposomes qu'au-dessus d'une certaine température qui correspond sensiblement à la température de fusion des chaînes paraffiniques des lipides considérés. Or, le processus de lyophilisation fait appel à de basses températures et l'homme de l'art devrait, en conséquence, s'attendre à ce que cette lyophilisation détruise la structure des liposomes. L'invention

a permis de constater que, contrairement à toutes les déductions logiques de l'homme de l'art, le passage des liposomes par des basses températures et l'élimination d'eau ne détruisaient pas la structure des liposomes, de sorte que les lyophilisats de liposomes peuvent être réhydratés et redonner naissance par réhydratation à des dispersions aqueuses identiques aux dispersions initiales avant lyophilisation.

Il est clair que l'invention permet d'améliorer considérablement les possibilités d'utilisation pratiques des liposomes puisque par lyophilisation on évite pendant tout le temps de la conservation à l'état lyophilisé, toute transformation des liposomes, c'est-à-dire toute coalescence et toute migration par perméabilité des substances actives enfermées dans les liposomes. En effet, on a pu constater que ce procédé de lyophilisation permet d'obtenir des liposomes dont la quantité de substance encapsulée n'est pas modifiée au cours de l'évaporation de l'eau. De plus, après réhydratation du lyophilisat on observe que la taille des liposomes est la même que celle avant lyophilisation. On peut donc envisager, grâce à l'invention, de préparer extemporanément des dispersions de liposomes ayant des tailles qui correspondent à une très grande instabilité, car il suffit de lyophiliser ces dispersions suffisamment vite après leur préparation pour pouvoir les maintenir pendant un temps de stockage quelconque à l'état lyophilisé et les régénérer ensuite par réhydratation au moment désiré. De plus, les lyophilisats de liposomes selon l'invention possèdent les avantages généraux des produits lyophilisés, sur le plan de la protection contre la contamination bactérienne et de l'oxydation en particulier.

La présente invention a, en conséquence, pour objet un procédé de conservation de composition à base de dispersions aqueuses de sphérules dites liposomes, constituées de couches moléculaires organisées, entre lesquelles est encapsulée une phase aqueuse, renfermant au moins une substance active, ces couches étant constituées d'au moins un composé lipidique ayant pour formule générale



formule dans laquelle Y représente un groupe lipophile et X représente un groupe hydrophile ionique ou non-ionique, le diamètre des sphérules étant compris entre 100 et 50 000 Å environ,

-----, caractérisé par le fait qu'en premier lieu, on prépare, de façon connue, une dispersion aqueuse de liposomes ; qu'en deuxième lieu, on soumet ladite dispersion à une lyophilisation réalisée de façon classique, afin d'obtenir une pâte ou un solide ; et qu'en
5 troisième lieu, peu de temps avant l'utilisation de la composition, on réhydrate le lyophilisat pour régénérer la composition initiale.

Dans un mode préféré de mise en oeuvre du procédé selon l'invention, on introduit dans la composition de liposomes à conserver des charges destinées à empêcher la prise en masse ou en mot-
10 te des produits obtenus par lyophilisation ; les charges peuvent avantageusement être choisies dans le groupe formé par les sels minéraux, la silice colloïdale, les amidons et les aluminosilicates tels que les bentonites ; la lyophilisation est obtenue en abaissant la température de la composition de liposomes au-dessous de -30°C, la
15 composition étant disposée en une couche de faible épaisseur, et en faisant évaporer à une température comprise entre 15 et 60°C, sous une très basse pression ; la pression d'évaporation est de l'ordre de 0,01 millibar, la température du condensateur étant d'environ -70°C et l'évaporation étant maintenue pendant environ 12 heures.

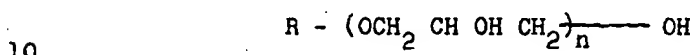
20 La présente invention a également pour objet le produit industriel nouveau que constitue une composition de liposomes lyophilisée telle qu'obtenue à la deuxième étape du procédé ci-dessus défini.

Dans un mode préféré de réalisation, la composition selon
25 l'invention comprend des charges destinées à empêcher la prise en masse ou en motte ; les charges sont choisies dans le groupe formé par les sels minéraux, la silice colloïdale, les amidons et les aluminosilicates ; les composés lipidiques constitutifs des liposomes sont, pour tous les liposomes de la composition, ou bien des composés
30 ioniques, ou bien des composés non-ioniques ; les liposomes de la composition sont d'au moins deux types, les substances actives enfermées dans les liposomes de chaque type étant différentes ; pour les composés lipidiques constitutifs des liposomes de la composition, Y représente une chaîne lipophile contenant de 12 à 30 atomes de
35 carbone ; Y peut avantageusement être choisi dans le groupe formé par les chaînes laurique, tétradécylique, hexadécylique, oléique, isostéarylique, lanolique ou alcoylphényl ----- ; X peut avantageusement être un groupement hydrophile non-ionique choisi dans la classe formée par des groupements polyoxyéthylénés ou polyglycé-
40 rolés et des esters de polyol oxyéthylénés ou non. X peut également

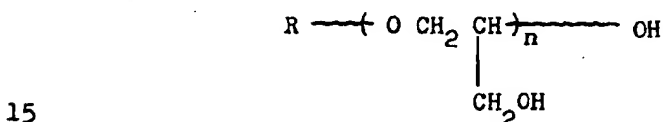
être avantageusement un groupement hydrophile ionique formé par un composé amphotère comportant deux chaînes lipophiles avec une association de deux ions ----- de signes opposés.

Dans le cas où les composés lipidiques formant les liposomes sont des composés non ioniques, lesdits composés lipidiques peuvent avantageusement être choisis dans le groupe formé par :

- les éthers de polyglycérol linéaires ou ramifiés de formules respectives :



et



n étant un entier compris entre 1 et 6, R étant une chaîne aliphatique linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée, comprenant de 12 à 30 atomes de carbone, les radicaux hydrocarbonés des alcools de lanoline ou les restes hydroxy-2-alkyle des α -diols à longue chaîne ;

- les alcools gras polyoxyéthylénés ;
- les esters de polyol oxyéthylénés ou non et, par exemple, les esters de sorbitol polyoxyéthyléné ;
- 25 - les glycolipides d'origine naturelle ou synthétique, par exemple les cérébrosides.

Dans la composition qui est soumise à la lyophilisation, la phase aqueuse encapsulée dans les liposomes est une solution aqueuse de substances actives ; la phase continue qui entoure les liposomes est une phase aqueuse isotonique par rapport à la phase encapsulée de la dispersion ; la proportion du poids des liposomes par rapport au poids de la phase continue de la dispersion est comprise entre 0,01 et 0,5 environ.

Dans le cas où les liposomes sont obtenus à partir de composés lipidiques non-ioniques, les compositions soumises à la lyophilisation peuvent comprendre divers additifs en vue de modifier la perméabilité ou la charge superficielle des liposomes. On citera à cet égard l'addition éventuelle des alcools et diols à longue chaîne, des stérols, par exemple le cholestérol, des amines à longue chaîne et de leurs dérivés ammonium-quaternaires, des dihydroxyalkyl-amines, des amines grasses

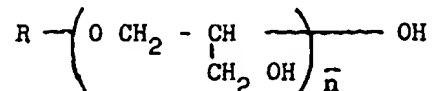
polyoxyéthylénées, des esters d'amino-alcools à longue chaîne, de leurs sels et dérivés ammonium-quaternaires, des esters phosphoriques d'alcools gras, par exemple de dicétyl-phosphate de sodium, des alkylsulfates, par exemple le cétyl-sulfate de sodium, de certains polymères, tels que les polypeptides et les protéines.

La composition soumise à la lyophilisation peut comporter des liposomes renfermant des substances actives de toutes sortes, et en particulier des substances ayant un intérêt pharmaceutique, ou alimentaire, ou des substances ayant une activité cosmétique. Les substances actives peuvent être, par exemple, en ce qui concerne la cosmétique : les produits destinés aux soins de la peau et du cheveu, par exemple des humectants, tels que la glycérine, le sorbitol, le pentaérythritol, l'inositol, l'acide pyrrolidone-carboxylique et ses sels ; des agents de brunissage artificiels tels que la dihydroxyacétone, l'érythrulose, la glycéraldéhyde, les δ -dialdéhydes tels que l'aldéhyde tartrique (ces produits pouvant éventuellement être associés à des colorants) ; des agents antisolaires hydrosolubles ; des anti-perspirants, des déodorants, des astringents, des produits rafraichissants, toniques, cicatrisants, kératolytiques, dépilatoires ; des eaux parfumées ; des extraits de tissus animaux ou végétaux, tels que protéines, polysaccharides, liquide amniotique ; des colorants hydrosolubles, des agents anti-pelliculaires, des agents antiséborrhéiques, des oxydants (agents de décoloration) comme l'eau oxygénée, des réducteurs tels que l'acide thioglycolique et ses sels. Comme substances actives pharmaceutiques on peut citer : les vitamines, les hormones, les enzymes, (par exemple, la superoxyde dismutase), les vaccins, les anti-inflammatoires (hydrocortisone, par exemple) les antibiotiques, les bactéricides.

Pour mieux faire comprendre l'objet de l'invention, on va en décrire maintenant, à titre d'exemples purement illustratifs et non limitatifs, plusieurs modes de mise en oeuvre et plusieurs modes d'utilisation.

Exemple 1 :

Dans un ballon de 100 ml, 320 mg du produit de formule générale :



R étant le radical alcoyle des alcools de lanoline hydrogénée et \bar{n} ayant une valeur statistique moyenne de 3, et 80 mg de cholestérol sont dissous dans 5 ml d'un mélange chloroforme/méthanol dans le rapport 2 : 1. On évapore le solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis on élimine les dernières traces de solvant en soumettant le produit pendant 1 heure à la pression réduite donnée par une pompe à palette.

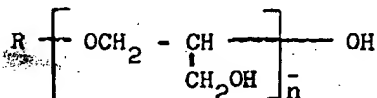
A la température de 40°C, on met le film lipidique obtenu en contact avec 10 ml d'une solution aqueuse à 8% du sel de triéthanolamine de l'acide urocanique. Le ballon est ensuite placé sur une secoueuse et fortement agité pendant 2 heures à 40°C ; puis on refroidit progressivement jusqu'à revenir à la température ambiante. La dispersion obtenue est fluide. La taille des liposomes est inférieure ou égale au micron.

On plonge le ballon dans l'azote liquide avec un mouvement de rotation sur lui-même afin d'obtenir la congélation du produit sur les parois du ballon, puis on le place pendant 12 heures dans un lyophilisateur. On obtient de cette manière un produit pâteux que l'on conserve pendant plusieurs jours.

Par addition d'au moins 3,5 ml d'eau au produit lyophilisé ainsi conservé, on obtient à nouveau une dispersion de sphères ayant un diamètre inférieur ou égal au micron.

Exemple 2 :

Dans le fond d'un tube à essais de 30 ml, on mélange intimement à l'aide d'une spatule 190 mg du produit de formule générale :



où R est le radical hexadécyle et \bar{n} a une valeur statistique moyenne de 3, 190 mg de cholestérol et 20 mg de dicétylphosphate de sodium. Le mélange est fait à la température de 90°C puis ramené à 70°C par l'intermédiaire d'un bain-marie.

On met alors le mélange obtenu en contact avec 2,5 ml d'une solution aqueuse à 2% (pH 7) du sel de sodium de l'acide L-pyrrolidone carboxylique. On homogénéise à la spatule jusqu'à obtenir une phase lamellaire très hydratée. On ajoute 7,5 ml de la solution aqueuse à 2% (pH 7) du sel de sodium de l'acide L-pyrrolidone carboxylique. On immerge profondément dans la dispersion la tête d'un ultra-disperseur vendu sous la dénomination commerciale "ILA". On disperse

en augmentant progressivement la vitesse de rotation jusqu'à la vitesse maximum que l'on maintient pendant environ 30 minutes. On laisse la température du bain-marie revenir progressivement à l'ambiante. La dispersion obtenue est fluide. La taille des liposomes est de l'ordre du micron.

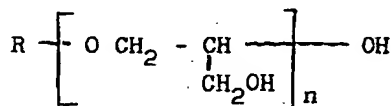
On transvase la dispersion dans un ballon rond de 100 ml que l'on plonge dans l'azote liquide avec un mouvement de rotation sur lui-même afin d'obtenir la congélation du produit sur les parois du ballon, puis on le place pendant 12 heures dans un lyophilisateur. On obtient de cette manière un produit pâteux, de couleur blanche, que l'on peut conserver.

Par addition de plus de 3,5 ml d'eau au produit lyophilisé, on obtient une dispersion de sphérules individualisées dont la taille moyenne est de l'ordre du micron.

Il est possible de soumettre aux ultra-sons la dispersion de liposomes avant la lyophilisation : la taille des sphérules est alors très faible (diamètre : 500-1 000 Å). Après lyophilisation et réhydratation du lyophilisat, on obtient une dispersion de liposomes de même diamètre.

Exemple 3 :

Dans le fond d'un tube à essais de 30 ml, on mélange intimement à l'aide d'une spatule 75 mg du produit de formule générale :



R étant le radical hexadécyle et n étant égal à 2, avec 20 mg de cholestérol et 5 mg de dicétyl-phosphate. Le mélange est fait à la température de 70°C au moyen d'un bain-marie.

On met ce mélange en contact avec 2,5 ml d'une solution aqueuse de chlorure de sodium à 5%. On homogénéise à la spatule jusqu'à obtenir une phase lamellaire très hydratée. On ajoute 7,5 ml de la solution aqueuse de chlorure de sodium à 5%. On immerge profondément dans la dispersion la tête d'un ultra-disperseur "ILA". On disperse en augmentant progressivement la vitesse de rotation de la tête jusqu'à la vitesse maximum que l'on maintient pendant environ 30 minutes. On laisse la température du bain-marie revenir progressivement à l'ambiante. La dispersion obtenue est fluide. La taille des liposomes est de l'ordre du micron.

On transvase la dispersion dans un ballon rond de 100 ml

que l'on plonge dans l'azote liquide avec un mouvement de rotation sur lui-même, afin d'obtenir la congélation du produit sur les parois du ballon. On laisse le ballon pendant 12 heures dans un lyophilisateur. On obtient de cette manière un produit poudreux, de 5 couleur blanche que l'on peut conserver.

Par addition d'au moins 1 ml d'eau au produit conservé, on obtient une dispersion des sphérules individualisées ayant une taille moyenne de l'ordre du micron.

La dispersion initiale peut être également soumise aux 10 ultra-sons avant lyophilisation, pour réduire la taille des liposomes de la dispersion.

Exemple 4 :

Dans un ballon rond de 100 ml, 128 mg de lécithine d'oeuf hydrogénée, 15 mg de cholestérol, 7 mg de dicétyl-phosphate sont 15 dissous dans 5 ml d'un mélange chloroforme/méthanol dans le rapport 2 : 1. On évapore le solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis on élimine les dernières traces de solvant en soumettant le produit pendant 1 heure à la pression réduite donnée par une pompe à palettes.

20 On met le film lipidique obtenu en contact avec 4 ml d'une solution aqueuse d'acide ascorbique 0,3 M. L'expérience est faite à la température de 40°C. Le ballon placé sur une secoueuse est fortement agité pendant 2 heures à 40°C, puis refroidi progressivement jusqu'à revenir à la température ambiante. La dispersion ob- 25 tenue est fluide. La taille des liposomes est inférieure ou égale au micron.

On plonge le ballon dans l'azote liquide avec un mouvement de rotation sur lui-même afin d'obtenir la congélation du produit sur les parois du ballon, puis on le place dans un lyophilisateur 30 pendant 12 heures. On obtient de cette manière un produit pâteux de couleur blanche, que l'on peut conserver.

Par addition de plus de 1,5 ml d'eau au produit conservé, on obtient une dispersion de liposomes individualisés de tailles inférieures ou égales au micron.

35 La dispersion initiale peut également être soumise aux ultra-sons avant lyophilisation, pour réduire la taille des liposomes.

Exemple 5 :

Dans le fond d'un tube à essais de 30 ml, on mélange inti- 40 mement à l'aide d'une spatule 300 mg de lécithine d'oeuf, 80 mg

de cholestérol, et 20 mg de dicétyl-phosphate. Le mélange est fait à la température de 60°C, puis ramené à 40°C au moyen d'un bain-marie.

On met alors le mélange obtenu en contact avec 2,5 ml
5 d'une solution aqueuse à 2,5% (pH=7) du sel de sodium de l'acide lactique. On homogénéise à la spatule jusqu'à obtenir une phase lamellaire très hydratée. On ajoute 7,5 ml de la solution aqueuse du sel de sodium de l'acide lactique à 2,5%. On immerge profondément dans la dispersion la tête d'un ultra-disperseur "ILA". On disperse
10 en augmentant progressivement la vitesse de rotation de la tête jusqu'à la vitesse maximum que l'on maintient pendant environ 30 minutes. On laisse la température du bain-marie revenir progressivement à l'ambiante. La dispersion obtenue est fluide. La taille des liposomes est supérieure au micron. La dispersion peut être soumise
15 aux ultra-sons sous azote ; la taille des liposomes devient alors très inférieure au micron (250-1 000 Å).

On transvase la dispersion obtenue dans un ballon rond de 100 ml que l'on plonge dans l'azote liquide avec un mouvement de rotation sur lui-même afin d'obtenir la congélation du produit sur
20 les parois du ballon. On laisse alors le ballon pendant 12 heures dans un lyophilisateur. On obtient de cette manière un produit pailleté de couleur brune, que l'on peut conserver.

Par réhydratation du produit conservé avec au moins 3,5 ml d'eau, on retrouve des liposomes individualisés de taille inférieure (250-1 000 Å) ou supérieure au micron selon que la dispersion a été ou non soumise aux ultra-sons avant lyophilisation.

Exemple 6 :

Dans le fond d'un tube à essais de 30 ml, on mélange intimement à l'aide d'une spatule 300 mg de lécithine d'oeuf, 80 mg
30 de cholestérol et 20 mg de dicétyl-phosphate de sodium. Le mélange est fait à la température de 60°C, puis ramené à 40°C au moyen d'un bain-marie.

On met alors le mélange obtenu en contact avec 2,5 ml d'une solution aqueuse à 1‰ de l'enzyme superoxyde dismutase.
35 On homogénéise à la spatule jusqu'à obtenir une phase lamellaire très hydratée. On ajoute 7,5 ml de la solution aqueuse à 1‰ de l'enzyme superoxyde dismutase. On immerge profondément dans la dispersion la tête d'un ultra-disperseur "ILA". On disperse en augmentant progressivement la vitesse de rotation de la tête
40 jusqu'à la vitesse maximum que l'on maintient pendant environ

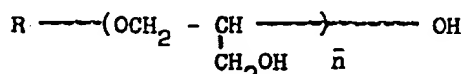
30 minutes. On laisse la température du bain-marie revenir progressivement à l'ambiante. La dispersion obtenue est fluide. La taille des liposomes est supérieure au micron. La dispersion peut être soumise aux ultra-sons sous azote ; la taille des liposomes devient alors très inférieure au micron (250-1 000 Å).

On transvase la dispersion obtenue dans un ballon rond de 100 ml et on introduit 300 mg d'aluminosilicate dans le ballon que l'on place environ 30 minutes sur une secoueuse. On plonge le ballon dans l'azote liquide avec un mouvement de rotation sur lui-même, afin d'obtenir la congélation du produit sur les parois du ballon. On laisse alors le ballon pendant 12 heures dans un lyophilisateur. On obtient de cette manière un produit blanc, poudreux que l'on peut conserver.

Par réhydratation du produit conservé avec au moins 3,5 ml d'eau, on retrouve des liposomes individualisés de taille inférieure (250-1 000 Å) ou supérieure au micron, selon que la dispersion a été ou non soumise aux ultra-sons avant lyophilisation.

Exemple 7 :

Dans un ballon de 100 ml, 320 mg du produit de formule générale



R étant le radical alkyl des alcools de lanoline hydrogénée et \bar{n} ayant une valeur statistique moyenne de 3, et 80 mg de cholestérol sont dissous dans 5 ml d'un mélange chloroforme/méthanol dans le rapport 2:1. On évapore le solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis on élimine les dernières traces de solvant en soumettant le produit pendant 1 heure à la pression réduite donnée par une pompe à palettes.

A la température de 40°C, on met le film lipidique obtenu en contact avec 10 ml d'une solution aqueuse à 3% de glycérol.

Le ballon est ensuite placé sur une secoueuse et fortement agité pendant 2 heures à 40°C ; puis on refroidit progressivement jusqu'à revenir à la température ambiante. La dispersion obtenue est fluide. La taille des liposomes est inférieure ou égale au micron.

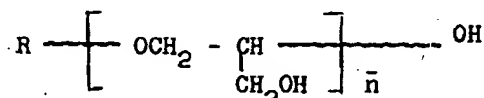
On introduit 500 mg d'aluminosilicate dans le ballon que l'on replace environ 30 minutes sur la secoueuse.

On plonge le ballon dans l'azote liquide avec un mouvement de rotation sur lui-même afin d'obtenir la congélation du produit sur les parois du ballon, puis on le place pendant 12 heures dans un lyophilisateur. On obtient de cette manière un produit blanc, poudreux, que l'on peut conserver.

Par addition d'au moins 3,5 ml d'eau au produit lyophilisé ainsi conservé, on obtient à nouveau une dispersion de sphérules ayant un diamètre inférieur ou égal au micron.

Exemple 8 :

Dans le fond d'un tube à essais de 30 ml, on mélange intimement à l'aide d'une spatule 180 mg du produit de formule générale



où R est le radical hexadécyle et \bar{n} a une valeur statistique moyenne de 3, 180 mg de cholestérol et 40 mg de dicétyl-phosphate de sodium. Le mélange est fait à la température de 90°C puis ramené à 50°C par l'intermédiaire d'un bain-marie.

On met alors le mélange obtenu en contact avec 2,5 ml d'une solution aqueuse à 5% d'immuno globulines Ig A. On homogénéise à la spatule jusqu'à obtenir une phase lamellaire très hydratée. On ajoute 7,5 ml de la solution aqueuse à 9 % de chlorure de sodium. On immerge profondément dans la dispersion la tête d'un ultra-disperseur vendu sous la dénomination "IIA". On disperse en augmentant progressivement la vitesse de rotation jusqu'à la vitesse maximum que l'on maintient pendant environ 30 minutes. On laisse la température du bain-marie revenir progressivement à l'ambiante. La dispersion obtenue est fluide. La taille des liposomes est supérieure ou égale au micron.

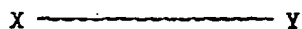
On plonge le ballon dans l'azote liquide avec un mouvement de rotation sur lui-même afin d'obtenir la congélation du produit sur les parois du ballon, puis on le place pendant 12 heures dans un lyophilisateur. On obtient de cette manière un produit blanc, poudreux.

Par addition de plus de 3,5 ml d'eau au produit lyophilisé, on obtient une dispersion de sphérules individualisées dont la taille moyenne est supérieure ou égale au micron.

Il est bien entendu que les modes de mise en oeuvre ci-dessus décrits ne sont aucunement limitatifs et pourront donner lieu à toutes modifications désirables, sans sortir pour cela du cadre de l'invention.

RE V E N D I C A T I O N S

- 1 - Procédé de conservation de composition à base de dispersions aqueuses de sphérules dites "liposomes", constituées de couches moléculaires organisées, entre lesquelles est encapsulée
- 5 une phase aqueuse, renfermant au moins une substance active, ces couches étant constituées d'au moins un composé lipidique ayant pour formule générale



- formule dans laquelle Y représente un groupe lipophile et X représente un groupe hydrophile ionique ou non-ionique, le diamètre des sphérules étant compris entre 100 et 50 000 Å, caractérisé par le fait qu'en premier lieu, on prépare, de façon connue, une dispersion aqueuse de liposomes ; qu'en deuxième lieu, on soumet ladite dispersion à une lyophilisation réalisée de façon classique, afin
- 15 d'obtenir une pâte ou un solide ; et qu'en troisième lieu, peu de temps avant l'utilisation de la composition, on réhydrate le lyophilisat pour régénérer la composition initiale.

- 2 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que l'on introduit dans la composition de liposomes à conserver des charges destinées à empêcher la prise en masse ou en motte
- 20 des produits obtenus par lyophilisation.

3 - Procédé selon la revendication 2, caractérisé par le fait que les charges sont choisies dans le groupe formé par les sels minéraux, la silice colloïdale, les amidons et les aluminosilicates.

- 25 4 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé par le fait que la lyophilisation est obtenue en abaissant la température de la composition de liposomes au-dessous de -30°C, ladite composition étant disposée en une couche de faible épaisseur, et en faisant évaporer à une température comprise entre 15 et 60°C,
- 30 sous une très basse pression.

5 - Composition de liposomes lyophilisée obtenue à la deuxième étape du procédé selon la revendication 1.

- 6 - Composition selon la revendication 5, caractérisée par le fait qu'elle comprend des charges destinées à empêcher la prise
- 35 en masse ou en motte.

7 - Composition selon la revendication 6, caractérisée par le fait que les charges sont choisies dans le groupe formé par les sels minéraux, la silice colloïdale, les amidons et les aluminosilicates.

- 8 - Composition selon l'une des revendications 5 à 7, caractérisée par le fait que les composés lipidiques constitutifs des
- 40

liposomes sont ----- ou bien des composés ioniques, ou bien des composés non-ioniques.

9 - Composition selon l'une des revendications 5 à 8, caractérisée par le fait que les liposomes qu'elle contient sont d'au moins deux types, les substances actives enfermées dans les liposomes de chaque type étant différentes.

10 - Composition selon l'une des revendications 5 à 9, caractérisée par le fait que, pour les composés lipidiques constitutifs des liposomes de la composition, Y représente une chaîne lipophile contenant de 12 à 30 atomes de carbone.

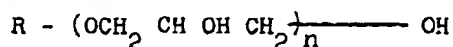
11 - Composition selon la revendication 10, caractérisée par le fait que Y est choisi dans le groupe formé par les chaînes laurique, tétradécylrique, hexadécylrique, oléique, isostéarylique, lanolique ou alcoylphényl.

12 - Composition selon l'une des revendications 5 à 11, caractérisée par le fait que, pour les composés lipidiques constitutifs des liposomes de la composition, X représente un groupement hydrophile non-ionique choisi dans la classe formée par des groupements polyoxyéthylénés ou polyglycérolés et des esters de polyol oxyéthylénés ou non.

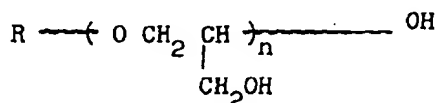
13 - Composition selon l'une des revendications 5 à 11, caractérisée par le fait que, pour les composés lipidiques constitutifs des liposomes de la composition, X est un groupement hydrophile ionique formé par un composé amphotère comportant deux chaînes lipophiles avec une association de deux ions organiques de signes opposés.

14 - Composition selon l'une des revendications 5 à 9 dans laquelle les composés lipidiques formant les liposomes sont des composés non-ioniques, caractérisée par le fait que lesdits composés lipidiques sont choisis dans le groupe formé par :

- les éthers de polyglycérol linéaires ou ramifiés de formules respectives :



et



n étant un entier compris entre 1 et 6, R étant une chaîne aliphatique linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée, comprenant de 12

à 30 atomes de carbone, les radicaux hydrocarbonés des alcools de lanoline ou les restes hydroxy-2-alkyle des α -diols à longue chaîne ;

- les alcools gras polyoxyéthylénés ;
- 5 - les esters de polyol oxyéthylénés ou non et, par exemple, les esters de sorbitol polyoxyéthylénés ;
- les glycolipides d'origine naturelle ou synthétique, par exemple les cérébrosides.

15 - Composition selon l'une des revendications 5 à 14, caractérisée par le fait qu'elle comporte des additifs visant à modifier la perméabilité ou la charge superficielle des liposomes et pris dans le groupe formé par les alcools et diols à longue chaîne, les stérols, les amines à longue chaîne et leurs dérivés ammonium-quaternaires, les dihydroxyalkyl-amines, les amines grasses polyoxyéthylénées, les esters d'amino-alcools à longue chaîne ainsi que leurs sels et dérivés ammonium-quaternaires, les esters phosphoriques d'alcools gras, les alkylsulfates, les polypeptides et les protéines.

16 - Composition selon l'une des revendications 5 à 15, caractérisée par le fait que les liposomes renferment des substances actives à activité cosmétique prises dans le groupe formé par les produits destinés aux soins de la peau et du cheveu, les humectants tels que la glycérine, le sorbitol, le pentaérythritol, l'inositol, l'acide pyrrolidone-carboxylique et ses sels, les agents de brunissage artificiels tels que la dihydroxyacétone, l'érythrulose, la glycéraldéhyde, les γ -dialdéhydes, lesdits agents de brunissage pouvant être éventuellement associés à des colorants, les agents antisolaires hydrosolubles, les anti-perspirants, les déodorants, les astringents, les produits rafraichissants, toniques, cicatrisants, kératolytiques, dépilatoires, les eaux parfumées, les extraits de tissus animaux ou végétaux, tels que protéines, polysaccharides, liquide amniotique, les colorants hydrosolubles, les agents antipelliculaires, les agents antiséborrhéiques, les oxydants tels que l'eau oxygénée, les réducteurs tels que l'acide thioglycolique et ses sels.

17 - Composition selon l'une des revendications 5 à 15, caractérisée par le fait que les liposomes renferment des substances à activité pharmaceutique telles que des vitamines, des substances alimentaires, des hormones, des enzymes, des vaccins, des anti-inflammatoires, des antibiotiques et des bactéricides.